

氏名	まつやま ようへい 松山 洋平
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	博甲第689号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Photoreactive oligonucleotides for the regulation of RISC function and their application to the analysis of epigenetic variations in DNA. (光応答性核酸素子を用いた RISC の機能制御及びエピジェネティック変異の検出)
審査委員	(主査)教授 村上 章 教授 山口政光 教授 田嶋邦彦 准教授 小堀哲生

論文内容の要旨

生命活動は、遺伝子発現が特定の部位・時間において適切に行われることで、初めて正常な状態を維持することができる。しかし、何らかの要因によって遺伝子発現態様に異常が生じると、ガンなどの重篤な疾患や慢性疾患の発症につながる。本論文ではこの様な背景から、核酸素子を用いた遺伝子発現の特異的制御ならびに外部刺激による時空間的制御を可能とする技術を開発し、疾患治療や遺伝子発現の解析ツールへと展開することを目的としている。外部刺激として即時性と位置特異性に優れている「光」に着目している。本研究では、特に① microRNA を始めとしたタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) による遺伝子発現調節機構、② エピジェネティックな遺伝子発現制御機構において重要な役割を担う、DNA 中のシトシン塩基のメチル化、に焦点を絞り、これらの現象を光照射により制御する原理の確立ならびにその実証を行っている。

Chapter 1 では、光照射によって標的遺伝子と架橋する機能性アンチセンス核酸(ASO)の分子設計ならびにその評価結果を論じている。光応答性分子として、ソラレン誘導体を採用し、Firefly luciferase mRNA を負に制御する microRNA をターゲットとした ASO を開発した。HeLa 細胞中で行った評価実験の結果、ASO は光照射によって microRNA の遺伝子制御能を顕著に抑制した。

Chapter 2 では、RNA-タンパク質複合体(RISC:RNA-induced silencing complex)と ASO との相互作用を直接的に解析する手法の開発を論じている。microRNA は細胞中で RISC を形成することにより、遺伝子発現を調節しており、その効果は、RISC と ASO との結合親和性に依存する。しかしながら、ASO と RISC との結合親和性に関する研究はほとんど報告されておらず、本研究では、その結合親和性の定量的評価に取り組んでいる。HEK293T 細胞由来の細胞破砕液を用いた *in vitro* RNAi system を応用し、RISC と ASO との結合親和性を評価した。その結果、ASO と RISC との結合親和性(K_d)と、ASO の生細胞中での microRNA 機能阻害効果との間には有意な相関関係が確認された。一方、生細胞中での ASO の microRNA 機能阻害効果と、ASO と microRNA との熱力学的安定性(T_m)との間に相関関係は見られなかった。以上の結果から、ASO と RISC との結合親和性は、ASO の持つ microRNA 機能阻害効果に多大な影響をおよぼす、重要なファクターであることが示された。

Chapter 3 では、遺伝子のエピジェネティック変異の代表例であるメチル化シトシン(5-mC)の配列特異的な検出および機能制御分子の開発を論じている。ゲノム DNA 鎖中のプロモーター領域におけるシトシン塩基(C)のメチル化異常が疾患発症の原因となることが報告されている。従って、DNA 鎖中の 5-mC を配列特異的に検出する手法の開発は、疾患の診断や治療につながる。しかし、正常な C と 5-mC の違いを識別することはこれまで困難であった。本論文では C と 5-mC のソラレンとの反応性の違いを利用した識別法開発を行っている。その結果、ソラレンの 5-mC に対する反応性は、C の場合と比較して約 4 倍高いことが明らかとなった。以上の結果はエピジェネティック変異の一つである 5-mC の配列特異的な検出に成功したことを示しており、光架橋性 ASO を用いることで、5-mC の検出だけでなく配列特異的な機能制御法への応用も可能であることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

ヒトゲノムプロジェクトの結果が報告されるにつれ、遺伝子の発現に関する新たな発見が数多く報告された。とりわけ、タンパク質をコードしない non-coding RNA の生命現象への密接な関係、例えば 22 塩基長程度の短鎖 RNA(microRNA)の機能の多様性と重要性が注目されている。またエピジェネティックな DNA 修飾の多様性も生命現象に予想以上に深く関わっていることも明らかになってきている。これらはいずれも疾患の発症に深く関わっていることが報告されており、この観点に注目した研究は、将来、難治性疾患の治療に大きく貢献する可能性があると考えられている。

本論文は 3 章からなっており、上述の観点から新しい分子の開発や機構の解明を論じている。Chapter 1 では microRNA の遺伝子制御能の不活性化を目指し、光架橋性のアンチセンス核酸を設計し、microRNA 選択的な制御を実現している。その際、本論文では光を用いているが、この手法は microRNA の時空間的解析を可能にする新しい手法であり、高く評価できる。Chapter 2 では、RNA-タンパク質複合体(RISC:RNA-induced silencing complex)の機能解析を行っている。RISC は近年報告され、その作用機構に未解明な点を多く有する分子群である。RISC の種選択的制御は疾患治療の要であり、現時点ではアンチセンス核酸法が有力な手法とされている。しかしながら、RISC 選択的アンチセンス核酸分子の設計には確立した手法が無く、試行錯誤の状態にある。本論文ではアンチセンス核酸設計における指針を提案しており、今後の関連研究に大いに貢献するものと考えられ高く評価できる。Chapter 3 では、エピジェネティック修飾によって生じる DNA 変異の新たな検出法を論じている。5-メチル化シトシン(5mC)が DNA に存在することの証明は、エピジェネティック変異の詳細を理解する上で重要であるが、これまでは複雑な化学反応を必要としていた。本論文では未修飾のシトシン(C)と 5mC 間で、光架橋性基ソラレンとの光反応性の違いを見だし、新規かつ簡便な 5mC 検出法開発に成功している。今後の基礎ならびに応用研究の成果が期待される。

以上のように本論文は生体で重要な働きをする RNA 関連分子の選択的制御に関する重要な概念、手法開発を論じ、また、今後の遺伝子研究の重要課題であるエピジェネティクスに関わる重要な検出法を提案している。その学術的意義は高く、また今後の DNA, RNA 研究の重要な概念、手法として高く評価される。

本論文は審査を経て掲載された以下の 2 編の学術論文(うち 1 編は申請者が筆頭著者である)並びに現在投稿準備中の論文に基づいて作成されている。

1. Matsuyama, Y., Yamayoshi, A., Kobori, A., Murakami A. "Functional regulation of

RNA-induced silencing complex by photoreactive oligonucleotides" *Bioorg Med Chem*, **22**,1003-1007 (2014).

2. Yamayoshi, A., Matsuyama, Y., Kushida, M., Kobori, A., Murakami A. "Novel photodynamic effect of psoralen-conjugated oligonucleotides for discrimination of methylation of cytosine in DNA", *Photochemistry and Photobiology*, DOI: 10.1111/php.12232.

3. Matsuyama, Y., Yamayoshi, A., Kobori, A., Murakami, A. "Evaluation of binding affinities between RISC and artificial oligonucleotides: new insights for a design principal of inhibitors targeting microRNA" *in preparation*.